第29卷 第2期 昆 虫 学 报 Vol. 29, No. 2
1986年5月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1986

棉铃虫核多角体病毒DNA的限制性内切酶酶解图谱和电镜观察

李敏棠 忻纪厚 李载平
(中国科学院上海生物化学研究所)
张士芸 乐云仙 苏德明
(复旦大学生物系)

摘要 棉铃虫核多角体病毒(NPV)加入0.01 $M Na_2CO_3$—0.05 $M NaCl$ 溶解后，用水饱和苯酚-SDS提取NPV DNA。电镜观察证明NPV DNA为非均一性环状结构分子。测量了28个分子的长度，其中15个分子长度为27±5 μm，相当分子量为$(73\pm 13)\times 10^6$道尔顿，其余的是较大和较小的分子。限制性内切酶 XbaI, XhoI, BamHI, EcoRI, Bgl II 分别把NPV DNA酶解为20,9,10,18和11个限制性片段。由片段总和法计算得平均分子量是73.3×10^6道尔顿。

关键词 棉铃虫多角体病毒 DNA 限制性内切酶酶解图谱 电镜观察

昆虫核多角体病毒(NPV)是一个具有包涵体的环状双链DNA病毒，属杆状病毒科(Baculoviridae)，A亚组(Matthews, 1982)。根据NPV核壳中所包含病毒粒子的数目，又可把它分成单粒包埋(SNPV)和多粒包埋(MNPV)两个形态型。NPV广泛地分布在昆虫中，是昆虫传染性病毒病主要病原体之一，在自然界中控制病害虫数量发展起着非常重要的作用。由于NPV感染昆虫具有专一性，在环境中稳定，对靶寄主快速致死以及对非靶寄主、脊椎动物和植物安全等特性，是一个很有发展前途的生物杀虫剂。目前，包括美国棉铃虫NPV在内已有一些病毒制剂作为商品杀虫剂出售。

NPV种类繁多，借助于DNA限制性内切酶酶解图谱分析可鉴别不同寄主来源(Miller和Dawes 1978; Smith和Summers, 1978; Jewell和Miller, 1980)、同种寄主NPV不同地区分离株(Brown等, 1981; Gettig和McCarthy, 1982; Naomi和Marvin, 1982)和变异株(Lee和Miller, 1978; Kelly等, 1980; Smith和Summers, 1979)。由于该技术灵敏而方便，因而可作为基因突变的指标，监测病毒杀虫剂在使用过程中的遗传变化，为连续使用的安全性提供依据。NPV结构和感染途径的特异性，使它有可能作为病毒DNA—寄主DNA互相作用的研究系统和改造成为真核基因克隆的运载体，在真核基因调控研究和基因工程上发挥作用。国外最近已报道成功地把苜蓿银纹夜蛾NPV DNA用作表达人β干扰素基因的运载体(Smith等, 1983)。

棉铃虫 *Heliothis armigera* NPV(简称HaNPV，下同)的生物学特性已经有过一些报道(乐云仙等, 1978; 蒋正揆等, 1978)，HaMNPV和HaSNPV一些地区分离株的DNA

本文于1984年8月收到。
本实验所用之限制性内切酶由中国科学院生物化学研究所七室提供；电镜观察得到复旦大学遗传所电镜室协作，特此致谢。

限制性内切酶图谱也有过报道(Gettig 和 McCarthy，1982)。本文报道 HaSNPV 上海分离株的 DNA 限制性图谱及电镜观测的分子量。

材料和方法

一、NPV 的制备

把四龄幼虫，以 2×10^7 多角体/ml 加入饲料中添食感染，收集感染死亡的幼虫，加蒸馏水匀浆；匀浆液用 4 层纱布过滤，滤液以 4,000 g 离心 30 分钟，取沉淀，并反复用蒸馏水洗涤。用胰酶、溶菌酶 (1 mg/ml) 37℃ 保温 1 小时，再用蒸馏水洗涤后铺于 35—65% (wt/wt) 蔗糖梯度上，以 20,000 rpm 离心 30 分钟，收集 55% 梯度处的白色沉淀，经蒸馏水洗后即为 NPV 制剂。

二、NPV DNA 的分离

参照家蚕 NPV DNA 的分离方法(李敏棠等，1981)。加入 0.01 M Na_2CO_3—0.05 M NaCl 溶液于多角体沉淀中，使悬浮液 pH 值达 10 左右。室温放置 1—2 小时，间中摇动。接着加入等体积水饱和苯酚-十二烷基硫酸钠(最终浓度为 0.5%)，摇动约 30 分钟。低速离心使混合液分层，吸取上层水相，再用水饱和苯酚抽提 1—2 次，至不出现蛋白质层为止。最后，水相加入 2.5 倍体积冷乙醇，用玻棒卷出 DNA 纤维状沉淀，溶于灭菌水中备用。

三、NPV DNA 的电镜观察

参照 Evenson (1977) 方法进行制片。上相液为 0.5 M NH_4AC，0.05 mg/ml 细胞色素 C，下相液为 0.25 M NH_4AC。用 Hitachi H500H 电子显微镜观察，以 pBR 322 作内标，按 HaNPV DNA 测量长度/pBR 322 DNA 测量长度 $\times 2.6\times10^6$ 道尔顿公式计算 HaNPV DNA 的分子量。

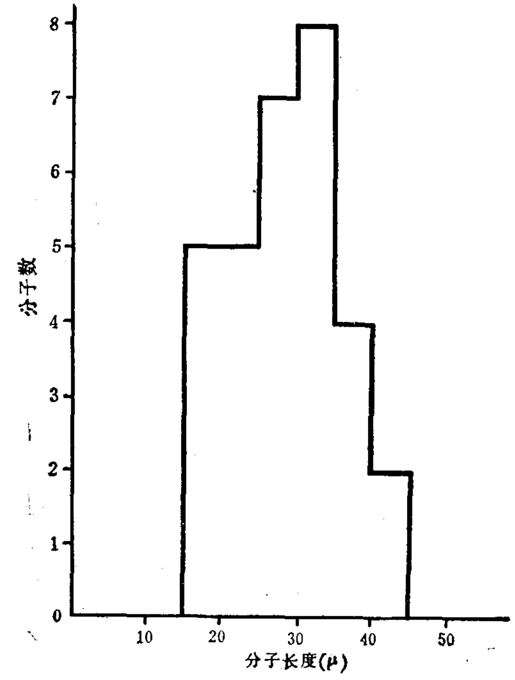


图 1 HaSNPV DNA 环状分子长度分布

四、NPV DNA 限制性内切酶酶解和限制性片段电泳分离

NPV DNA 的限制性内切酶 EcoR I, Xho I, Xba I 的酶解作用在 50 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ 和 10 mM 巯基乙醇缓冲液中进行；BamHI, Bgl II 在 10 mM Tris (pH 7.4), 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM 巯基乙醇缓冲液中进行。用 3 倍以上酶量，37℃ 保温 3—6 小时。酶解片段在 0.7% 琼脂糖板凝胶作电泳分离，同时以 λDNAEcoR I 和 Hind III 限制性片段作分子量标准。电泳缓冲液为 40 mM Tris, 20 mM NaAC(pH 7.6), 2 mM 乙二胺四乙酸二钠。电泳电压 20—25 伏，电泳时间 15 小时以上。电泳毕，凝胶以 0.5 μg/ml 溴

化乙锭染色 15 分钟后在紫外光下拍摄。

结　　果

HaSNPV DNA 电镜观察表明，样品中除环状结构分子外，还有少量长短不一的线形分子，估计后者是抽提 DNA 的过程中环状分子断裂所致。测量了 28 个环状分子的长度，其中最小的一个为 18.7 μm，最大的一个为 42.5 μm。图版 I:1 展示一个长度为 29.8 μm 的 HaNPV DNA 环状分子。28 个环状分子的长度分布在图 1 说明。

分布在 15—20 μm 长度间的分子有 5 个；20—25 μm 间有 7 个：25—30 μm 间 8 个；30—35 μm 4 个；35—40 μm 2 个；40—45 μm 2 个。具有 27±5 μm 长度的分子有 15 个，约占统计分子总数的 54%，考虑把此长度作为这 HaSNPV DNA 的"标准"环状分子长度，按 HaSNPV DNA 测量长度/pBR 322 DNA 测量长度 $\times 2.6\times 10^6$ 道尔顿计算式计算，则其分子量约 $(73\pm 13)\times 10^6$ 道尔顿。

NPV DNA 经限制性内切酶酶解后，其限制性片段与 λDNA EcoR I 和 Hind III 片段同时在 0.7% 琼脂糖板凝胶作电泳分离，结果如图版 I:2。图 2 为图版 I:2 示意图。图中表明，HaSNPV DNA Xba I 片段为 20；Xho I 9；BamH I 10；EcoR I 18；Bgl II 11。以

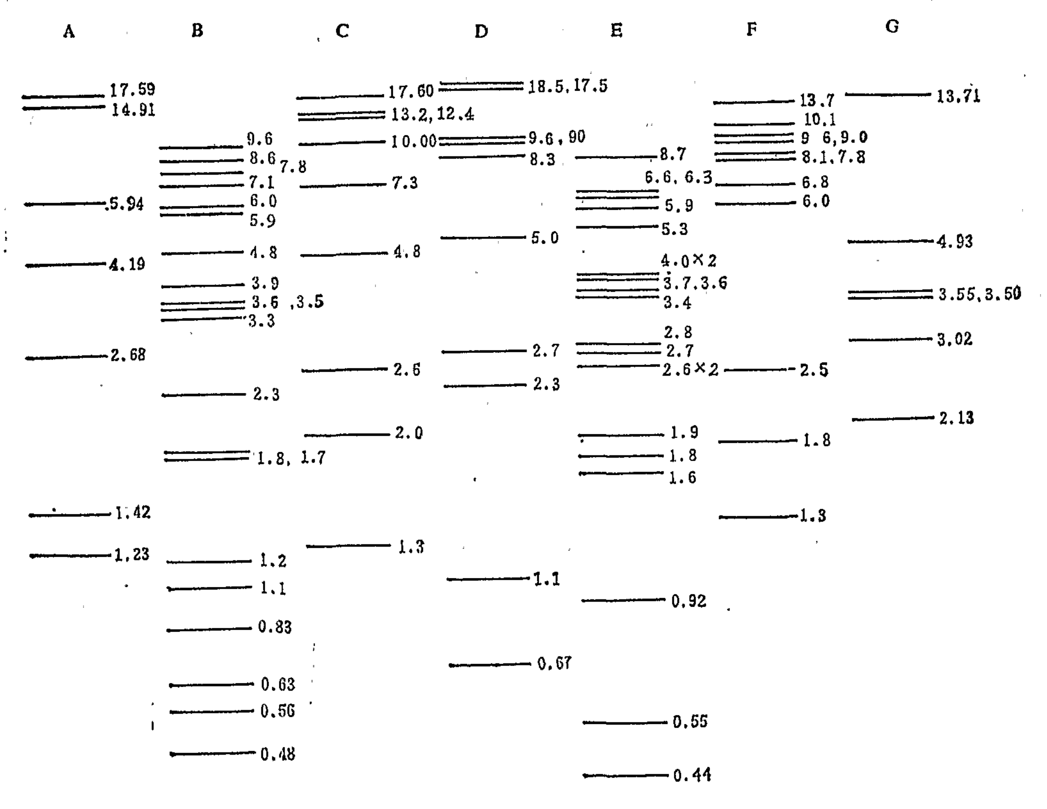


图 2　HaSNPV DNA 限制性内切酶酶解片段电泳图谱示意图

A. λDNA Hind III B. HaSNPV DNA XbaI C. HaSNPV DNA XbaI D. HaSNPV DNA BamHI E. HaSNPV DNA EcoR I F. HaSNPV DNA Bgl II G. λDNA EcoR I.
右边数字示片段分子量（$\times 10^6$ 道尔顿）

λDNA EcoR I 和 Hind III 片段作分子量标准取对数对其泳度作标准曲线，从标准曲线上测量 NPV DNA 各限制性片段分子量，其值于图 2 上注明。HaSNPV DNA 分子量用片段分子量总和法计算，其结果为 HaSNPV DNA Xba I 74.7，Xho I 71.2，BamHI 74.7，EcoR I 69.4，Bgl II 76.7 $\times 10^6$ 道尔顿。五种酶所得之值作平均为 73.3×10^6 道尔顿。

讨 论

电镜下测量 HaSNPV DNA 28 个环状分子，其长度分布于 18.7—42.5 μm 间，最小与最大相差达 2 倍多。其分布峰值在 27 ± 5 μm 处，约相当 $(73\pm13)\times10^6$ 道尔顿，与用限制性内切酶限制性片段总和法测得的平均分子量 73.3×10^6 道尔顿相等，亦与 Gettig 和 McCarthy 报道 HaSNPV 湖北省分离株的 DNA 分子量 74×10^6 道尔顿一致。

Gettig 和 McCarthy (1982) 作了 HaSNPV DNA EcoR I 和 Hind III 图谱。湖北与上海 HaSNPV 分离株 DNA 就其 EcoR I 图谱比较而言，二者除在最小的 6 个片段的大小及相对位置相仿外，其余的片段对应关系相距甚远。限制性内切酶图谱是 DNA 碱基序列的具体反映，同种 NPV 不同地区的分离株 DNA 限制性图谱之巨大差异，反映这些病毒不断地发生变异。

HaSNPV DNA 环状分子长度非均一性的现象，在美国棉铃虫 NPV(Scharnhorst 等，1977)，大蜡螟 NPV (Strokovkaya 等，1978)，家蚕 NPV (Кок 等，1972) 以及我们的蓖麻蚕 NPV、茶尺蠖 NPV 等 DNA 中亦有所发现。美国棉铃虫 NPV DNA 环状分子的长度分布在 15—45 μm 间，峰值在 20—25 μm 处，最小与最大差 3 倍，而家蚕、蓖麻蚕、茶尺蠖 NPV DNA 大小环长度差竟达 6 倍。产生非均一性的原因还有待研究，但就从 HaSNPV DNA 而论，由于电镜测得的"标准"长度 (27 μm) 的环状分子的分子量与用限制性内切酶限制性片段总和法所测得的分子量相等，推断这些参差不齐的分子是高度同源的，否则二者之值将发生较大的偏离。但不能排除一些带有"特殊"片段的大分子的存在，由于这类分子为数甚微，致使这"特殊"片段无法在凝胶电泳上检出。

参 考 文 献

乐云仙等 1978 棉铃虫核型多角体病毒病的研究 (I) 病征和病原物。复旦大学学报 (1): 79—85。

蒋正揆等 1978 棉铃虫核型多角体病毒病的研究 (II) 病毒毒力的生物测定。复旦大学学报 (4): 85—92。

李敏棠等 1981 家蚕核多角体病毒 DNA 的限制性内切酶酶解图谱和感染性。科学通报，**26**(22):1391—6。

Brown, D. A. et al. 1981 Biological and biochemical investigation of five European isolates of *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus. *Arch. Virol.* **69**: 209—17

Evenson, D. P. 1977 Electron microscopy of viral nucleic acid. Methods in virology. 6: 219—64

Gettig, R. R. and McCarthy, W. J. 1982 Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis* spp. nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. *Virol.* **117**: 245—52

Jewell, J. E., and Miller L. K. 1980 DNA sequence homology relationships among six lepidopteran nuclear polyhedrosis viruses. *J. Gen. Virol.* **48**: 161—75

Kelly, D. C. et al. 1980 Biochemical, biophysical and serological properties of two singly enveloped nuclear polyhedrosis viruses from *Heliothis armigera* and *Heliothis zea*. *Microbiologica* **3**: 319—31

Lee, H. H. and Miller, L. K. 1978 Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis. *J. Virol.* **27**: 754—67.

Matthews, R. E. F. 1982 Classification and nomenclature of viruses. KARGER.

Miller, L. K. and Dawes, K. P. 1978 Restriction endonucleases analysis for the identification of baculoviruses pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 411—21.

Naomi Kislev and Marvin Edelman 1982 DNA restriction-pattern difference from geographic isolates of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. *Virol.* **119**: 219—22.

Smith, G. E. and Summers, M. D. 1978 Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virol.* 89: 517—27.

Smith, G. E. and Summers, M. D. 1979 Restriction mape of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Gallera mellonella* MNPV DNAs with endonucleases SmaI, KpnI, BamHI, SacI, XhoI, and EcoRI. *J. Virol.* **30**: 828—38.

Smith, G. E. et al. 1983 Production of human beta interferon in insect cell infected with a baculovirus expression vector. *Mollecular and cellular biology* 3: 2136—65.

Scharnhorst, D. W. et al. 1977 Structural studies on the polyhedral inclusion bodies, virions, and DNA of the nuclear polyhedrosis virus of the cotton bollworm *Heliothis Zea*. *J. Virol.* **21**: 292—300.

Strokovkaya, L. I. et al. 1978 Macromolecular structure of genom of nuclear polyhedrosis virus of *Galleria mellonella* L. *Arch. virol.* 54: 171—80.

Кок, И. П., и др. 1972 О Макромолекулярной структре днк Вируса ядстрного полиэдроза тутового шелкопряда. *Молекулярная биология* **6**: 323—31.

RESTRICTION PATTERNS AND ELECTRON MICROSCOPY OF NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS DNA OF *HELIOTHIS ARMIGERA*

LI MIN-TANG XIN JI-HOU LI ZAI-PING

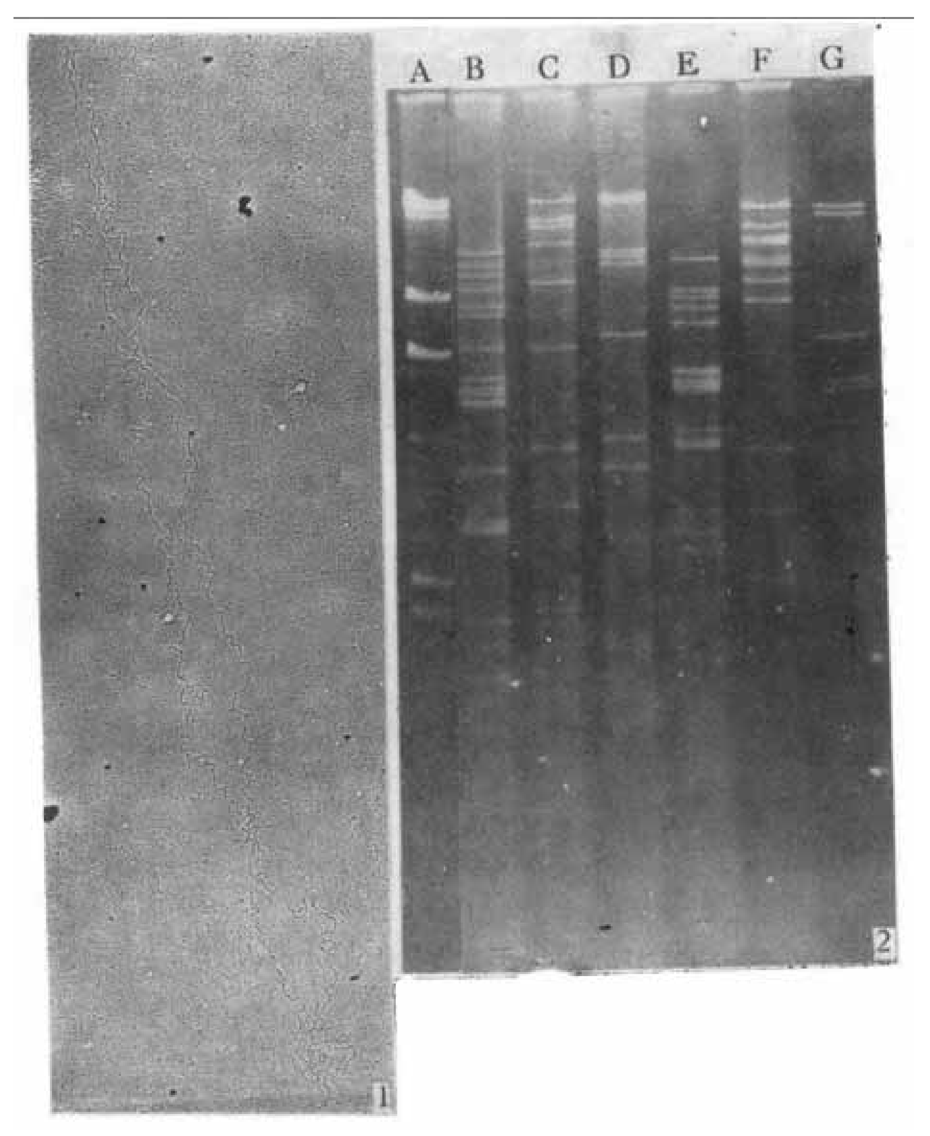
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

ZHANG SHI-YUN YUE YUN-XIAN SU DE-MING

(Department of Biology, Fudan University)

SNPV of *Heliothis armigera* (HaSNPV) was extracted twice with water-saturated phenol-SDS and studied by electron microscopy. It was found that the NPV DNA molecules were circular and heterogeneous in size. Twenty eight molecules were measured. Among them fifteen were 27 ± 5 μm in length, corresponding to a molecular weight of $(73\pm13)\times10^6$ daltons. The others were smaller or greater in dimension. Restriction endonuclease assay revealed that XbaI, XhoI, BamHI, EcoRI, and BglII cleaved the NPV DNA into 20, 9, 10, 18, and 11 fragments respectively. The molecular weights of NPV DNA as calculated from the XbaI, XhoI, BamHI, EcoRI, and BglII NPVDNA fragments were 74.7, 71.2, 74.7, 69.4, and 76.7×10^6 daltons, respectively.

Key words HaSNPV DNA——restriction patterns——electron microscopy



1. HaSNPV DNA 电镜像(×15800)示长度为 29.8 μm 的环状结构分子。
2. HaNPV DNA 限制性内切酶酶解片段电泳图。0.7% 琼脂糖板凝胶，电压 25 伏，电泳 16 小时。

A: λDNA HindIII; B: HaNPV DNA XbaI C: HaNPV DNA XhoI; D: HaNPV DNA BamHI E: HaNPV DNA EcoRI; F: HaNPV DNA BglII G: λDNA EcoRI